临床研究

PPAR-γ2 基因-C34G、NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T多态性与幽门螺杆菌感染的交互作用和食管鳞状细胞癌的关系

张超贤[1],郭李柯[2],张利利[1],韩 宇[1]
新乡医学院第一附属医院[1]消化内科,[2]口腔科,河南 卫辉 453100

摘要:目的 探讨过氧化物酶体增殖因子活化受体-γ2(PPAR-γ2)基因-C34G、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶p22phox亚基基因-C242T多态性与幽门螺杆菌(*H. Pylori*)感染的交互作用和食管鳞状细胞癌(ESCC)的关系。**方法** 选择我院2010年5月~2015年3月收治的ESCCBroder Ⅰ级、Broder Ⅱ级和Broder Ⅲ级患者各200例,以200例健康体检者作为对照组,以上述各组患者的外周血白细胞为样本,利用PCR-RFLP检测PPAR-γ2 基因-C34G和NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T多态性。采用14C-UBT检测受检者*H. Pylori*与14C结合的每分钟衰变数(DPM)以判断*H. Pylori*感染情况。采用非条件Logistic回归对-C34G、-C242T多态性与*H. Pylori*感染的交互作用进行分析。**结果** -C34G(CG)和-C34G(GG)基因型者患ESCC的风险均显著增加,-C242T(CT)和-C242T(TT)基因型者患ESCC的风险也显著增加。基因突变的协同分析发现-C34G(GG)和-C242T(TT)基因型在ESCC发生、发展存在正向的交互作用,另外在-C34G(CG)和-C242T(TT)之间、-C34G(CG)和-C242T(CT)之间及-C34G(GG)和-C242T(CT)之间均存在正向交互作用(γ均大于1)。*H. Pylori*感染者患ESCC的风险性均明显增高。*H. Pylori*感染与-C34G(CG)、-C34G(GG)、-C242T(CT)和-C242T(TT)基因型与均有正向交互作用(γ均大于1)。**结论** 携带-C34G(CG)、-C34G(GG)、-C242T(CT)和-C242T(TT)基因型的个体属ESCC高危险人群,这些基因型和*H. Pylori*感染的交互作用促进了ESCC的发生、发展,应当采取根除*H. Pylori*或调控基因表达的措施以达到有效预防LSCC的目的。

关键词:食管鳞状细胞癌;过氧化物酶体增殖因子活化受体-γ2基因-C34G;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶p22phox亚基基因-C242T;幽门螺杆菌;多态现象

Interaction of polymorphisms of PPAR-γ2 gene-C34G and NADPH oxidase subunit p22phox gene-C242T with *Helicobacter pylori* infection in esophageal squamous cell carcinoma

ZHANG Chaoxian[1], GUO Like[2], ZHANG Lili[1], HAN Yu[1]
[1]Department of Gastroenterology, [2]Depatment of Stomatology, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, China

Abstract: Objective To investigate the interaction of polymorphisms of PPAR-γ2 gene-C34G and NADPH oxidase subunit p22phox gene-C242T with *helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** A total of 200 cases of LSCC of Broder grade I, 200 of Broder grade II and of grade III were enrolled in this study with 200 healthy individuals as the control group. The genetic polymorphisms of PPAR-γ2 gene-C34G and NADPH oxidase subunit p22phox gene-C242T were analyzed using PCR-RFLP in peripheral blood leukocytes. ^{14}C-urea breath test (^{14}C-UBT) was used to test ^{14}C disntegration per minute (DPM) for evaluating the infection status of *H. pylori*. An unconditional logistic regression model was used to analyze the interaction of nucleotide polymorphisms and *H. pylori* infection. **Results** The risk of ESCC significantly increased in subjects with-C34G (CG), -C34G(GG), -C242T (CT), and-C242T (TT) genotypes. Combined analysis of the polymorphisms showed that the subjects carrying-C34G (GG)/-C242T (TT) had a high risk of ESCC, and a positive interaction was found between-C34G (GG) and-C242T (TT) in increasing the risk of ESCC. Positive interactions in the pathogenesis of ESCC were also found between-C34G (CG) and-C242T (TT), between-C34G (CG) and-C242T (CT), and between-C34G (GG) and-C242T (CT) (γ>1). The risk of ESCC significantly increased in subjects with *H. pylori* infection, which showed positive interactions with-C34G (CG), -C34G (GG), -C242T (CT) and-C242T (TT) in increasing the risk of ESCC (γ>1). **Conclusion** Individuals carrying-C34G(CG), -C34G(GG), -C242T (CT) and-C242T (TT) genotypes have a high risk of developing ESCC, and these genotypes interact with *H. pylori* infection in the pathogenesis of LSCC, suggesting the importance of eradicating *H. pylori* for prevention of ESCC.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; *Helicobacter pylori* infection; PPAR-γ2 gene-C34G; NADPH oxidase subunit p22phox gene-C242T; gene polymorphisms

收稿日期:2016-07-18
基金项目:河南省教育厅科研基金(20073200143)
作者简介/通信作者:张超贤,硕士,副主任医师,副教授,E-mail: nn21882001@aliyun.com

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是人类常见的恶性肿瘤之一,占全身恶性肿瘤的2%,全世界每年ESCC新发病例约31.04万,而我国病例就达16.72万[1],我国是ESCC的高发国家,也是本病死亡率最高的国家。ESCC病因和发病机制尚未完全明确,目前认为胰岛素抵抗和活性氧自由基、脂质过氧化损伤在ESCC发病中起重要作用,并与环境因素、遗传因素密切相关[2-3]。幽门螺杆菌(*H. pylori*)作为消化系统最常见的感染细菌之一,其在慢性活动性胃炎消化性溃疡胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤和胃癌等中的致病作用已得到证实[4-5]。近年研究还发现,*H. pylori*感染不仅与胃肠疾病相关,而且与一些胃肠以外的疾病也存在密切的相关性,可通过影响血脂代谢、胰岛素抵抗、炎症反应和氧化应激来参与其他部位恶性肿瘤的发生、发展[4]。过氧化物酶体增殖因子活化受体(peroxisomeproliferater-activatedreceptor, PPARs)是核激素受体配体激活的转录因子的超家族 其中PPAR-γ2主要富含于脂肪组织,对维持人类胰岛素敏感性、葡萄糖稳态是不可缺少的,当PPAR-γ2基因突变或受其他因素抑制时,将导致胰岛素抵抗,促进ESCC等恶性肿瘤的进展[7]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶是机体产生活性氧自由基的关键酶,其活性变化将直接影响机体活性氧自由基水平,在恶性肿瘤的发生、发展中发挥重大作用[8]。PPAR-γ2、NADPH氧化酶基因具有多态性,即具有多个等位基因,不同的等位基因编码的PPAR-γ2或NADPH氧化酶活性有差异。PPAR-γ2或NADPH氧化酶基因的多态性可使机体对外界环境(如*H. pylori*感染)的反应能力有所不同,这是决定机体ESCC易感性的一个重要因素。PPAR-γ2、NADPH氧化酶基因多态性与ESCC易感性的研究日渐增多,但尚未见*H. pylori*感染与上述基因多态性的联合作用对ESCC易感性影响的报道。为了研究PPAR-γ2、NADPH氧化酶在当地人群中的分布状态,进而探索其和*H. pylori*感染相互作用与ESCC高发的关系,我们在国内首次开展了PPAR-γ2 和NADPH氧化酶联合基因多态性与ESCC易感性关系的研究。

1 材料和方法

1.1 诊断标准

根据Broder的分级标准,将ESCC分为Ⅰ~Ⅳ级[9]。Ⅰ级鳞癌:其中所含的非典型鳞状细胞低于25%,癌细胞团块边缘在一些部位可见基底细胞排列尚完整,而在另一些部位则排列紊乱,甚至没有基底细胞。此时癌细胞与周围的间质无明显分界,癌组织的细胞排列不规则,大小不等,有不少角珠。有的中心部位已完全角化,有的仅部分角化。Ⅱ级鳞癌:癌细胞团块与周围间质的境界不清,非典型鳞状细胞较Ⅰ级为多,约25%~50%,角化情况轻,仅有少数角珠,其中心多见角化不全。周围的炎症反应较Ⅰ级为轻。Ⅲ级鳞癌:有大量的非典型鳞状细胞,约50%~70%,角化情况不明显,或根本见不到。不见角珠,可见个别角化不良细胞。胞核不典型,有丝分裂象显著,周围炎症不明显,说明组织对癌细胞的反应已不强。Ⅳ级鳞癌:几乎整个癌组织的细胞均为非典型鳞状细胞,且无细胞间桥。有丝分裂象多,已完全看不到角化情况,如癌细胞呈梭形时,常呈旋涡状排列。

1.2 纳入标准

(1)病理学确诊为ESCC;(2)年龄39~71岁,性别不限;(3)纳入研究时均为第1次就诊,未经任何化疗和放射治疗;(4)签署知情同意书。

1.3 排除标准

(1)合并有其他系统良、恶性肿瘤或癌前病变;(2)合并免疫系统疾病;(3)服抗*H. pylori*药物史;(3)合并其他如心功能、肾功能不全、呼吸功能障碍等重大疾病者;合并局部或全身严重感染;(4)妊娠及哺乳期妇女;(5)合并精神疾病或严重神经官能症患者,或由于智力或语言障碍,不能表达主观不适症状,妨碍与研究者的交流与合作者。

1.4 一般资料

按照上述的诊断、纳入和排除标准收集2010年5月~2015年3月在新乡医学院第一附属医院门诊和病房收治的ESCC病例和同期健康体检者。各组按照年龄(±3)、性别、居住地进行1∶1配对,包括BroderⅠ级组、BroderⅡ级组和BroderⅢ级组各200例,200例健康体检者作为对照组,均为豫北居民或在豫北10年及以上,各组性别比(男∶女)均为127∶73例;Ⅰ级组年龄41~68(49.25±11.46)岁;Ⅱ级组年龄40~69(49.42±9.83)岁;Ⅲ级组年龄42~68(48.74±12.26)岁;对照组年龄39~68(48.94±12.68)岁。4组在年龄、性别、民族和籍贯统计学处理差异无显著性,无血缘关系。Ⅳ级仅收集15例,不列入统计分析。采用统一的流行病学调查表,由经过专门培训的调查员对病例和对照组进行询问调查,收集研究对象的一般情况、健康相关行为、吸烟 、饮酒、饮食习惯、运动情况、疾病史。饮食因素主要包括:饮食习惯、碳水化合物、蔬菜水果、肉类、蛋类、油脂、家禽内脏、家畜内脏、煎炸食品等。饮食调查采用询问法,对主要膳食因素详细记录并折算成各种食物成分摄入量和产热量。饮食状况分为低脂饮食、高脂饮食(饮食中脂肪的产热量占总热量百分比超过25%持续1年以上定义为高脂饮食),吸烟状况本文分为不吸烟者、吸烟者(将每天至少吸1支烟,持续半年以上定义为吸烟者)。饮酒定义为饮酒折合乙醇量男性大于140 g/周(女性>70 g/周),持续半年以上。

1.5 *H. pylori*检测

^{14}C-UBT试剂盒由深圳市中核海得威生物科技有限公司提供，所有待用试剂的配制均按试剂盒说明书进行。检测仪器为HUBT-01卡式幽门螺杆菌检测仪（深圳市中核海得威生物科技有限公司）。患者在清晨空腹时或至少禁食6 h以后受试，受试前漱口，口服^{14}C-尿素胶囊一粒，嘱受试者整粒服下，20 mL温水送服，不得咬碎胶囊，3 min后再饮水20 mL，然后静坐15~20 min，等待采样。开启CO_2吸收剂1瓶，倾入洁净的液闪瓶内，嘱受试者通过吹气导管向CO_2吸收剂徐徐吹气，不能倒吸入嘴内，力度适中，避免液体溅出，当CO_2吸收剂的紫红色褪尽变为无色透明时，停止吹气。此时CO_2吸收剂刚好吸收到所需的CO_2采样量。向已采集呼气样品的液闪瓶内加入稀闪烁液4.5 mL，摇匀，测量样品每分钟衰变数（disntegration per minute, DPM），以试剂盒提供的DPM≥100为阳性标准，本研究将*H. pylori*感染状况分为未感染者（DPM<100）、100≤DPM<500感染者和DPM≥500感染者。

1.6 标本采集

每人各抽取静脉血2~3 mL，置乙二胺四乙酸钠抗凝管，分离白细胞层。用QIAampDNA提取试剂盒提取白细胞DNA，DNA置−30 ℃低温冰箱保存备用。

1.7 基因测定

（1）PPAR-γ2基因-C34G多态性分析[10]：引物序列为：上游引物5'-：CAAGCCCAGTCCTTTCTGTC3'，下游引物5'-：AGTGAAGGAATCGCTTTCCG-3'，由美国Research Genetics公司合成，PCR反应体系包括：基因组DNA 1 μL，上下游引物各2 μL，Taq DNA聚合酶Mix液（Takara公司）6 μL。反应条件为：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性及56 ℃退火各45 s，72 ℃延伸30 s，40个循环；最后72 ℃延伸7 min。PCR产物经Bio-Rad染色琼脂糖凝胶电泳确认扩增结果后，以限制性内切酶HpaⅡ酶切，37 ℃孵育4 h，取酶切产物4 μL经Bio-Rad染色琼脂糖凝胶电泳后，酶切产物放入紫外线凝胶成像仪观测；（2）NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T多态性分析[11]：引物序列为：上游引物5'TGCTTGTGGGTAAACCAAGGCCGGTG3'，下游引物：5'AACACTGAGGTAAGTGGGGGTGGCTCCTGT'，由上海生工生物技术有限公司合成。应用T aKaRa PCR Am-plification Kit（大连宝生物工程有限公司）PCR试剂盒在25 μL PCR反应体系中进行基因组DNA扩增，0.5 μg DNA基因组DNA，10×PCR Buffer 2.5 μL，含M gCl_2 1.5 μL（25 mol/L），2dNTP Mix ture 2 μL、TaKaRa Taq DNA聚合酶0.125 μL（5 U/μL），引物各1 μL（10 pmol/μL），灭菌去离子水17.375 μL。PCR反应条件如下：94 ℃ 4 min，94 ℃变性30 s，65 ℃ 3 min，70 ℃ 1 min，33个循环，最后70 ℃延伸10 min。取12 μL的PCR反应产物与限制性内切酶RsaⅠ（NEB公司）于37 ℃温浴过夜。酶切产物经3.5%琼脂糖凝胶电泳（含0.5 μg/mL溴乙啶）进行分析。

1.8 统计方法

Hardy-Weinberg平衡检验研究样本的群体代表性，以$P>0.05$为符合Hardy-Weinberg规律。用比值比（OR）值和95%可信区间（95% CI）评价相对风险，病例组和对照组之间的基因型频率和等位基因频率采用χ^2检验检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。非条件logistic回归模型分析交互作用。根据Khoury和Wagener提出的交互作用模型和交互系数（$\gamma=\beta_{eg}/\beta_e$）判断基因—环境交互作用模型以及交互作用类型[12]。判定依据1：$\gamma>1$，表示基因对环境暴露的效应有放大作用，正向交互作用；$\gamma<1$，表示基因对环境暴露的效应有减弱作用，负向交互作用；$\gamma=1$，表示基因对环境暴露没有交互作用。在病例对照研究中，γ为两变量lgOR的比值。判定依据2：$OR_{eg}=OR_e\times OR_g$为相乘模型；$OR_{eg}>OR_e\times OR_g$为超相乘模型；$OR_{eg}<OR_e\times OR_g$为次相乘模型；$OR_{eg}=OR_e+OR_g-1$为相。

2 结果

2.1 PPAR-γ2基因-C34G和NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T多态性检测结果的判断

PPAR-γ2基因-C34G PCR扩增片段长度为267 bp，扩增产物经限制性内切酶HpaⅡ消化后分为3种基因型：-C34G（CC）纯合子为224和43 bp的2条区带，-C34G（GG）纯合子为267的1条区带，-C34G（CG）杂合子为267、224和43 bp的3条区带（图1）。每组随机抽取20个初步确定了基因型的样本，用PCR扩增后，送上海生工生物工程技术服务公司进行DNA序列测定进行验证，获得了100%的一致。

PCR扩增后的NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T片段为348 bp，经限制性内切酶*Rsa*Ⅰ酶切分为3种基因型：-C242T（CC）纯合子基因型个体显示1条348 bp长的DNA片段，-C242T（TT）纯合子基因型个体显示188和160 bp两条区带，-C242T（CT）杂合子基因型个体则显示348、188和160 bp的3条区带（图2）。每组随机抽取20个初步确定了基因型的样本，用PCR扩增后，送上海生工生物工程技术服务公司进行DNA序列测定进行验证，获得了100%的一致。

2.2 ESCC组和对照组的一般资料分析

LSCC组和对照组性别、年龄分布差异无显著性意义（$P>0.05$）；LSCC BroderⅠ级、BroderⅡ级和BroderⅢ级各组高脂饮食率、吸烟率和饮酒率均显著高于对照组（$P<0.05$，表1）。

2.3 ESCC易感性与*H. pylori*感染的相关性分析

100≤DPM<500和DPM≥500*H. pylori*感染者频率

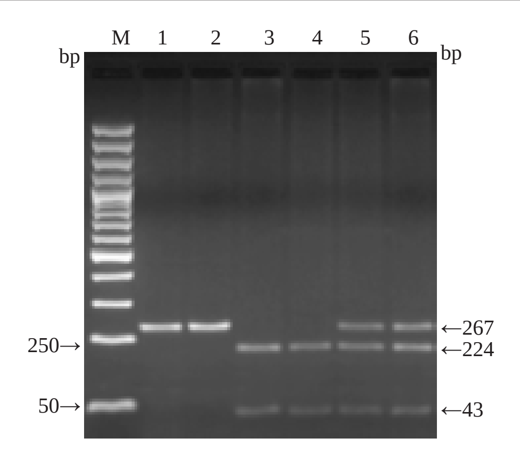


图1 PPAR-γ2基因-C34G PCR产物检测

Fig.1 PCR product of PPAR-γ2 gene-C34G. M: Marker; 1, 2: GG; 3, 4: CC; 5, 6: CG.

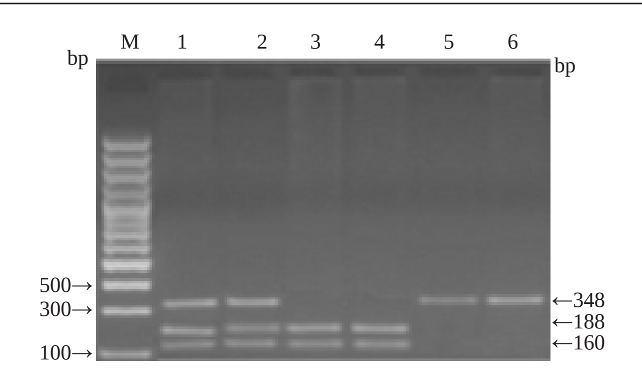


图2 NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T PCR产物检测

Fig.2 PCR product of NADPH oxidase subunit p22phox gene-C242T. M: Marker; 1, 2: CT; 3, 4: TT; 5, 6: CC.

表1 ESCC组和对照组的一般资料

Tab.1 General data of the ESCC cases and control group [n (%)]

Items	Control group	ESCC group					
		Grade I	P	Grade II	P	Grade III	P
Gender [n (%)]			0.1905		0.2147		0.1932
Male	120 (60.00%)	121 (60.50%)		119 (59.50%)		117 (58.50%)	
Female	80 (40.00%)	79 (39.50%)		81 (40.50%)		83 (41.50%)	
Age(year)	54.71±4.89	54.72±5.73	0.2318	54.63±9.25	0.2842	54.91±4.53	0.1726
Diet status			0.0086		0.0072		0.0049
Low-fat diet	161 (81.50%)	130 (65.00%)		105 (52.50%)		73 (36.50%)	
High-fat diet	39 (19.50%)	70 (35.00%)		95 (47.50%)		127 (63.50%)	
Smoking			0.0091		0.0076		0.0053
No	157 (78.50%)	128 (64.00%)		107 (53.50%)		75 (37.50%)	
Yes	43 (21.50%)	72 (36.00%)		93 (46.50%)		125 (62.50%)	
Drinking			0.0385		0.0219		0.0184
No	131 (65.50%)	119 (59.50%)		104 (52.00%)		90 (45.00%)	
Yes	69 (34.50%)	81 (40.50%)		96 (48.00%)		110 (55.00%)	

分布在Ⅰ级组分别为22.50%和26.50%，在Ⅱ级组分别为29.00%和40.50%，在Ⅲ级组分别为34.00%和51.50%，在对照组分别为15.50%和12.00%，上述*H. pylori*感染状况频率在Ⅰ级、Ⅱ级、Ⅲ级组与对照组之间均有显著差异（P均<0.01）。100≤DPM<500和DPM≥500 *H. pylori*感染者患ESCC的风险性均明显增高（$OR_{Ⅰ级}$=2.0636，$OR_{Ⅱ级}$=4.4474，$OR_{Ⅲ级}$=10.9677；$OR_{Ⅰ级}$=3.1393，$OR_{Ⅱ级}$=8.0225，$OR_{Ⅲ级}$=21.4583），而DPM≥500 *H. pylori*感染者患ESCC的风险性则又明显高于100≤DPM<500 *H. pylori*感染者（P<0.01）（表2）。

2.4 PPAR-γ2基因-C34G和NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T基因型和等位基因频率关联分析

经Hardy-Weinberg平衡检验，PPAR-γ2基因-C34G各基因型在对照组中的分布均符合Hardy-Weinberg规律（P>0.05），说明研究群体具有代表性（表3）。CC、CG和GG基因型频率在病例组和对照组差异有显著性（P<0.01）；等位基因G在ESCC组和对照组之间的分布差异具有统计学意义（P<0.01），且OR值大于1，说明含等位基因G的个体发生ESCC的风险相对较高；两位点的不同基因型在病例、对照组之间的分布差异均具有统计学

表2 ESCC易感性与*H. pylori*感染的相关性分析

Tab.2 Correlation analysis of ESCC susceptibility and *H. pylori* infection

Group	*H. pylori* infection status [*n* (%)]		
	Non-infection	100≤DPM<500	DPM≥500H
Control (*n*=200)	145 (72.50)	31 (15.50)	24 (12.00)
Grade I (*n*=200)	102 (51.00)	45 (22.50)	53 (26.50)
$OR^{a}_{Grade\ I}$	1.00	2.0636	3.1393(3)
95% $CI_{Grade\ I}$		1.2317-5.2186	1.9354-5.2175
$P_{Grade\ I}$		0.0092	0.0089
Grade II (*n*=200)	61 (30.50)	58 (29.00)	81 (40.50)
$OR^{a}_{Grade\ II}$	1.00	4.4474(1)	8.0225(1)(3)
95% $CI_{Grade\ II}$		2.5081-7.2194	4.4763-11.2165
$P_{Grade\ II}$		0.0085	0.0072
Grade III (*n*=200)	29 (14.50)	68 (34.00)	103 (51.50)
$OR^{a}_{Grade\ III}$	1.00	10.96771(1)(2)	21.4583(1)(2)(3)
95% $CI_{Grade\ III}$		6.2647-14.3210	16.2627-32.3215
$P_{Grade\ III}$		0.0063	0.0047

a: Adjusted according to gender, age, diet, drinking status and smoking status. (1)$P<0.01$ *vs* Grade I; (2)$P<0.01$ *vs* Grade II; (3)$P<0.01$ *vs* 100≤DPM<500 in the same group.

意义(*P*<0.01)。结果表明:PPAR-γ2基因-C34G(C→G突变)可能增加ESCC的患病风险(表3)。NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T3种基因型、等位基因频率亦符合上述规律(表4)。

表3 PPAR-γ2 基因-C34G基因型与等位基因分布

Tab.3 Distribution of PPAR-γ2 gene-C34G genotypes and alleles

Groups	Genotype [*n* (%)]			Allele [*n* (%)]	
	CC	CT	TT	C	T
Control (*n*=200)	143 (71.50)	28 (14.00)	29 (14.50)	314 (78.50)	86 (21.50)
Grade I (*n*=200)	99 (49.50)	49 (24.50)	52 (26.00)	247 (61.75)	153 (38.25)
$OR^{a}_{Grade\ I}$	1.00	2.5278	2.5900	1.00	2.2617
95% $CI_{Grade\ I}$		1.6347-4.2191	1.7380-4.7036		1.2041-3.8664
$P_{Grade\ I}$		0.0089	0.0085		0.0097
Grade II (*n*=200)	57 (28.50)	69 (34.50)	74 (37.00)	183 (45.75)	217 (54.25)
$OR^{a}_{Grade\ II}$	1.00	6.1823(1)	6.4017(1)	1.00	4.3295(1)
95% $CI_{Grade\ II}$		3.1762-9.3258	3.4726-9.8042		2.3790-7.9782
$P_{Grade\ II}$		0.0079	0.0072		0.0086
Grade III (*n*=200)	24 (12.00)	84 (42.00)	92 (46.00)	132 (33.00)	268 (67.00)
$OR^{a}_{Grade\ III}$	1.00	17.8750(1)(2)	18.9023(1)(2)	1.00	7.4130(1)(2)
95% $CI_{Grade\ III}$		9.3769-25.4301	11.3714-26.30852		4.3017-10.1854
$P_{Grade\ III}$		0.0052	0.0049		0.0074

a: Adjusted according to gender, age, diet, drinking status, smoking status and *H. pylori* infection status. (1)$P<0.01$ *vs* Grade I; (2)$P<0.01$ *vs* Grade II.

表4 NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T与等位基因分布

Tab.4 Distribution of NADPH oxidase subunit p22phox gene-C242T genotypes and alleles

Group	Genotype [*n* (%)]			Allele [*n* (%)]	
	CC	CT	TT	C	T
Control (*n*=200)	146 (73.00)	26 (13.00)	28 (14.00)	318 (79.50)	82 (20.50)
Grade I (*n*=200)	101 (50.50)	48 (24.00)	51 (25.50)	250 (62.50)	150 (37.50)
$OR^a_{Grade\ I}$	1.00	2.6687	2.6330	1.00	2.3268
95% $CI_{Grade\ I}$		1.5342-4.6813	1.5107-4.7136		1.3153-3.8719
$P_{Grade\ I}$		0.0087	0.0091		0.0094
Grade II (*n*=200)	58 (29.00)	70 (35.00)	72 (36.00)	186 (46.50)	214 (53.50)
$OR^a_{Grade\ II}$	1.00	6.7772(1)	6.4729(1)	1.00	4.4618(1)
95% $CI_{Grade\ II}$		3.4196-10.2115	3.1795-10.2181		2.3782-8.1506
$P_{Grade\ II}$		0.0071	0.0075		0.0081
Grade III (*n*=200)	22 (11.00)	87 (43.50)	91 (45.50)	131 (32.75)	269 (67.25)
$OR^a_{Grade\ III}$	1.00	22.2063(1)(2)	21.5682(1)(2)	1.00	7.9633(1)(2)
95% $CI_{Grade\ III}$		12.2647-29.3264	12.2657-31.1237		4.3706-9.1724
$P_{Grade\ III}$		0.0047	0.0045		0.0063

a: Adjusted according to gender, age, diet status, drinking status, smoking status and *H. pylori* infection status. (1)P<0.01 *vs* Grade I; (2)P<0.01 *vs* Grade II.

表5 非条件Logistic回归分析变量赋值表

Tab.5 Assignment of variables in non-conditional Logistic regression analysis

Factor	The name of variables	The value of variables
H. pylori infection	X1	Non-infection=0, 100≤DPM<500=1, DPM≥500=2, Non-infection as the reference factors
-C34G	X2	CC=0, CG=1, GG=1, CC as the reference factors
-C242T	X3	CC=0, CT=1, TT=1, CC as the reference factors

表6 LSCC危险因素的非条件Logistic回归分析

Tab.6 Non-conditional Logistic regression analysis of the risk factors of LSCC

Influencing factors	Reference factors	β	Wald χ^2	*P*	OR (95% CI)
H. pylori infection	Non-infection	0.8213	14.6893	<0.01	4.1685 (2.5372-7.2073)
H. pylori infection	Non-infection	1.4690	31.3281	<0.01	7.4576 (3.8387-10.7593)
-C34G(CG)	-C34G(CC)	0.8539	16.8035	<0.01	5.7313 (2.82980-9.2079)
-C34G(GG)	-C34G(CC)	0.8774	18.5236	<0.01	5.9720 (3.1583-9.6706)
-C242T(CT)	-C242T(CC)	0.9402	25.9173	<0.01	6.3600 (3.9852-10.8106)
-C242T(TT)	-C242T(CC)	0.9317	24.4872	<0.01	6.1650 (4.0325-9.6457)

2.5 LSCC危险因素的多因素非条件Logistic回归

为进一步分析LSCC的危险因素，将*H. pylori*感染状况、-C34G和-C242T基因型作为自变量，以是否发生LSCC作为因变量Y（0：未患LSCC；1：患-C242T，即Ⅰ级、Ⅱ级、Ⅲ级组各组患者），采用逐步后退法进行非条件Logistic回归，主要变量赋值见表5。结果显示，*H. pylori*

表7 PPAR-γ2基因-C34G和NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T多态性在ESCC发病中的交互作用

Tab.7 Interaction of polymorphisms of PPAR-γ2 gene-C34G and NADPH oxidase subunit p22phox gene-C242T with ESCC [*n* (%)]

Groups	Combined genotype of -C34G, and -C242T [*n* (%)]								
	CC/CC	CC/CT	CC/TT	CG/CC	CG/CT	CG/TT	GG/CC	GG/CT	GG/TT
Control (*n*=200)	104 (52.00)	19 (9.50)	20 (10.00)	20 (10.00)	4 (2.00)	4 (2.00)	22 (11.00)	3 (1.50)	4 (2.00)
Grade I (*n*=200)	50 (25.00)	24 (12.00)	25(12.50)	25 (12.50)	12 (6.00)	12 (6.00)	26 (13.00)	12 (6.00)	14 (7.00)
$OR^{a}_{Grade\ I}$	1.00	2.6274[b] (OR_1)	2.6000[c] (OR_2)	2.6000[d] (OR_3)	6.2400[e] (OR_{1*3})	6.2400[f] (OR_{2*3})	2.4582[g] (OR_4)	8.3200[h] (OR_{1*4})	7.2800[i] (OR_{2*4})
$95\%\ CI_{Grade\ I}$		1.3372-4.2108	1.2374-5.2183	1.2374-5.2183	3.9017-9.8561	3.9017-9.8561	1.0374-5.2516	5.0376-11.2487	4.0349-11.2124
$P_{Grade\ I}$		0.4195 (β_1)	0.4150 (β_2)	0.4150 (β_3)	0.7959 (β_{1*3})	0.7959 (β_{2*3})	0.3906 (β_4)	0.9201 (β_{1*4})	0.8621 (β_{2*4})
Grade II (*n*=200)	17 (8.50)	20 (10.00)	20 (10.00)	20 (10.00)	24 (12.00)	25 (12.50)	21 (10.50)	26 (13.00)	27(13.50)
$OR^{a}_{Grade\ II}$	1.00	6.4396[b] (OR_1)[(1)]	6.1176[c] (OR_2)[(1)]	6.1176[d] (OR_3)[(1)]	36.7059[e] (OR_{1*3})[(1)]	38.2343[f] (OR_{2*3})[(1)]	5.8396[g] (OR_4)[(1)]	53.0191[h] (OR_{1*4})[(1)]	41.2941[i] (OR_{2*4})[(1)]
$95\%\ CI_{Grade\ II}$		3.4274-10.2195	3.3418-9.9047	3.0725-9.2172	25.7906-43.9718	26.0307-45.3295	2.6086-9.7419	32.6529-76.8971	28.0369-65.2114
$P_{Grade\ II}$		0.8089(β_1)[(1)]	0.7866 (β_2)[(1)]	0.7866 (β_3)[(1)]	1.5647 (β_{1*3})[(1)]	1.5824 (β_{2*3})[(1)]	0.7664 (β_4)[(1)]	1.7244β ($_{1*4}$)[(1)]	1.6159 (β_{2*4})[(1)]
Grade III (*n*=200)	3 (1.50)	10 (5.00)	11 (5.50)	9 (4.50)	37 (18.50)	38 (19.00)	10 (5.00)	40 (20.00)	42 (21.00)
$OR^{a}_{Grade\ III}$	1.00	18.2456[b] (OR_1)[(1)(2)]	19.0667[c] (OR_2)[(1)(2)]	15.6000[d] (OR_3)[(1)(2)]	320.6667[e] (OR_{1*3})[(1)(2)]	329.3333[1f] (OR_{2*3})[(1)(2)]	15.7576[g] (OR_4)[(1)(2)]	462.2219[h] (OR_{1*4})[(1)(2)]	363.9724[i] (OR_{2*4}))[(1)(2)]
$95\%\ CI_{Grade\ III}$		11.2610-27.5473	11.7805-31.2596	9.0328-23.8758	270.3032-417.1824	282.1474-425.2187	9.0392-25.2471	398.5173-563.2182	297.0388-465.4694
$P_{Grade\ III}$		1.2611 (β_1)[(1)(2)]	1.2803(β_2)[(1)(2)]	1.1931 (β_3)[(1)(2)]	2.5061 (β_{1*3})[(1)(2)]	2.5176 (β_{2*3})[(1)(2)]	1.1975 (β_4)[(1)(2)]	2.6649 (β_{1*4})[(1)(2)]	2.5611 (β_{2*4})[(1)(2)]

a: Adjusted for gender, age, diet status, drinking, smoking and H. pylori infection status; b: OR value by simple-C242T heterozygote exposure (OR_1); c: OR value by simple-C242T homozygous mutant exposure (OR_2); d: OR value by simple-C34G heterozygote exposure (OR_3); e: OR value by the interaction between-C242T heterozygote and-C34G heterozygote (OR_{1*3}); f: OR value by the interaction between-C242T homozygous mutant and-C34G heterozygote (OR_{2*3}); g: OR value by simple-C34G homozygous mutant exposure (OR_4); h: OR value by the interaction between-C242T heterozygote and-C34G homozygous mutant (OR_{1*4}); i: OR value by interaction between-C242T homozygous mutants and-C34G homozygous mutant (OR_{2*4}). [(1)]$P<0.01$ *vs* Grade I; [(2)]$P<0.01$ *vs* Grade II.

感染、-C34G和-C242T有统计学关联(表6)。

2.6 PPAR-γ2基因-C34G和NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T多态性在ESCC发病中的交互作用

基因突变的协同分析发现-C34G(GG)/-C242T(TT)基因型者频率在Ⅰ级、Ⅱ级、Ⅲ级和对照组的分布频率分别为7.00%、13.50%、21.00%和2.00%,此基因型频率在各组之间均有显著性差异(P均<0.01)。-C34G(GG)/-C242T (TT)基因型者患ESCC的风险显著增加($OR_{Ⅰ级}$=7.2800,$OR_{Ⅱ级}$=41.2941,$OR_{Ⅲ级}$=363.9724),-C34G(GG)和-C242T(TT)基因型在ESCC发生、发展存在正向的交互作用($\gamma_2=\beta_{2*4}/\beta_4$,$\gamma_4=\beta_{2*4}/\beta_2$;$\gamma_{2Ⅰ级}$=2.2071,$\gamma_{4Ⅰ级}$=2.0773;$\gamma_{2Ⅱ级}$=2.1084,$\gamma_{4Ⅱ级}$=2.0543;$\gamma_{2Ⅲ级}$ =2.1387,$\gamma_{4Ⅲ级}$=2.0004),另外在-C34G (CG)和-C242T(TT)之间、-C34G (CG)和-C242T(CT)之间及-C34G(GG)和-C242T (CT)之间均存在正向交互作用(γ均大于1)(表7)。

2.7 *H. pylori*感染和PPAR-γ2基因-C34G和NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T多态性在ESCC发病中的交互作用

单纯100≤DPM<500的*H. pylori*感染的OR_{e1}在Ⅰ级组为2.2189,在Ⅱ级组为4.7273,在Ⅲ级组为12.6061,单独携带-C34G(CG)型的OR_{g1}在ESCC*H组为2.5267,在ESCC*M组为6.1176,在Ⅲ级组为19.8095,两者同时存在时,交互作用OR_{eg1}在Ⅰ级组为5.8367,在Ⅱ级组为30.5882,在ESCC*L组为251.3332,交互系数$\gamma=\beta_{eg1}/\beta_e$=>1,$OR_{eg1}>OR_e\times OR_{g1}$为超相乘模型;另外数据分析显示在100≤DPM<500和-C34G(GG)之间、DPM≥500和-C34G (CG)之间及DPM≥500和-C34G(GG)之间均存在正向交互作用(γ均大于1)(表8)。同样在100≤DPM<500和-C242T (CT)之间、100≤DPM<500和-C242T (TT)之间、DPM≥500和-C242T (CT)之间及DPM≥500和-C242T(TT)在ESCC发生、发展中也存在正向交互作用(γ均大于1)(表9)。

3 讨论

胰岛素抵抗除了造成患者能量物质代谢紊乱之外,可能通过高胰岛素血症、胰岛素样受体-1、核因子-κB抑制因子激酶-β/核因子-κB信号通路等参与恶性肿瘤的发病机制[13],PPAR-γ2是核受体家族中的成员,属于配体诱导的转录因子,作为脂肪酸的感受器,通过感受食物脂肪酸的信息,调节靶基因的转录,影响脂代谢酶、脂肪细胞因子的表达,通过调节其活性可促进脂肪细胞分化、预防脂质产生、增加脂肪酸氧化,提高胰岛素敏感性,另外PPARγ具有抗增殖及预调亡和促分化的功能,因而具有较全面的抗癌活性[14-15]。PPAR-γ2的表达受基因的控制和环境因素的诱导,其表达和诱导表达水平均有显著的个体差异。人PPAR-γ2基因定位于3p25,包括3个外显子和2个内含子,目前发现人类PPAR-γ2存在着多态性,最为普遍的是外显子B上34位点的C被G替换(C→G突变)而造成蛋白质12位点脯氨酸(Pro)替换为丙氨酸(Ala),此突变属于功能性变异,可影响PPAR-γ2的活性,减少血液和组织中PPAR-γ2的表达,从而影响其生物学效应。PPAR-γ2基因-C34G多态性具有三种基因型:-C34G(CC)、-C34G(CG)和-C34G(GG),国内外已有研究报道认为-C34G位点的多态性与代谢综合征有关[16-17]。本研究发现-C34G(CG)和-C34G(GG)基因型与ESCC发生、发展有关,与对照组比较差异有统计学意义,携带-C34G(CG)和-C34G(GG)基因型者ESCC的风险高于携带-C34G(CC)的个体与-C34G位点变异增加代谢综合征发病风险的结论一致。-C34G(CG)和-C34G(GG)基因型基因型者易患ESCCC的机理还不清楚,相关研究[18]显示PPAR-γ2的氨基酸端含有一个不依赖于配体而依赖于胰岛素的活化区域,-C34G(即Pro12Ala)即位于该区域内,脯氨酸(Pro)有防止α螺旋形成的作用,而丙氨酸(Ala)有促进α螺旋形成的作用该氨基酸的改变将造成PPAR-γ2结构的改变从而影响PPAR-γ2的转录活性降低PPAR-γ2表达,降低胰岛素敏感性,增加ESCC恶性肿瘤发生的危险性。

人体过多的活性活性氧簇(ROS)诱导nDNA单双链的结构断裂或者DNA链之间交联,或引起嘌呤、嘧啶及脱氧核糖改变而引发nDNA突变,其结果将介导原癌基因的激活或抑癌基因的失活,基因的改变将导致细胞异常增生而形成肿瘤,另一方面,ROS能攻击生物膜磷脂中诱发脂质过氧化反应,形成的脂质过氧化物可通过氧化碱基、损伤生物膜结构进而引起代谢失调、加重组织损伤参与肿瘤的发生发展[19-20]。氧化应激机制中,NADPH氧化酶是生成活性氧簇的主要来源,其主要亚基中质膜结合成分p22phox为跨膜亚基,是NADPH氧化酶酶促的核心作用部分,p22phox亚基的多态性影响NADPH氧化酶的功能。位于16号染色体4号外显子上的第242密码子存在C→T基因突变,使得编码的72号氨基酸由组氨酸变为酪氨酸。72号组氨酸残基是p22phox结合血红素的部位,由于基因的改变使p22phox结合血红素的能力下降,从而影响了NADPH氧化酶的活性[21]。研究证明NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T多态性可增加氧化应激相关疾病如冠心病、脑血管疾病等的的发病率[22-23]。本研究发现-C242T (CT)和-C242T (TT)基因型与ESCC的发生有关,与对照组比较差异有统计学意义(P<0.01),携带-C242T (CT)和-C242T (TT)基因型者患ESCC的风险高于携带-C242T (CC)的个体与相关研究结果一致。

本研究发现PPAR-γ2基因-C34G突变纯合型与

表8 *H. pylori*感染和PPAR-γ2基因-C34G多态性在ESCC发病中的交互作用

Tab.8 Interaction between *H. pylori* infection and PPAR-γ2 gene-C34G polymorphism in ESCC [*n* (%)]

Groups	-C34G genotypes and *H. pylori* infection status [*n* (%)]								
	CC+Non-infection	CC+100≤DPM<500	CC+DPM≥500	CG+Non-infection	CG+100≤DPM<500	CG+DPM≥500	GG+Non-infection	GG+100≤DPM<500	GG+DPM≥500
Control(n=200)	104 (52.00)	22 (11.00)	17 (8.50)	21 (10.50)	4 (2.00)	3 (1.50)	20 (10.00)	5 (2.50)	4 (2.00)
Grade I (*n*=200)	49 (24.50)	23 (11.50)	27 (13.50)	25 (12.50)	11 (5.50)	13 (6.50)	28 (14.00)	11 (5.50)	13 (6.50)
$OR^{a}_{Grade\ I}$	1.00	2.2189^{b} (OR_{e1})	3.3710^{c} (OR_{e2})	2.5267^{d} (OR_{g1})	5.8367^{e} (OR_{e1*g1})	9.1973^{f} (OR_{e2*g1})	2.9714^{g} (OR_{g2})	4.6694^{h} (OR_{e1*g2})	6.8980^{i} (β_{e2*g2})
95% $CI_{Grade\ I}$		1.1347-4.8873	2.1075-5.8338	1.1374-5.1646	3.1385-9.2760	6.6540-11.2760	1.2974-5.9502	2.5975-9.0752	3.5076-10.5825
$P_{Grade\ I}$		0.3461 (β_{e1})	0.5278 (β_{e2})	0.4026 (β_{g1})	0.7662 (OR_{e1*g1})	0.9637 (β_{e2*g1})	0.4730 (β_{g2})	0.6693 (β_{e1*g2})	0.8387
Grade II (*n*=200)	17 (8.50)	17 (8.50)	23 (11.50)	21 (10.50)	20 (10.00)	28 (14.00)	23 (11.50)	21 (10.50)	30 (15.00)
$OR^{a}_{Grade\ II}$	1.00	4.7273^{b} $(OR_{e1})^{(1)}$	8.2768^{c} $(OR_{e2})^{(1)}$	6.1176^{d} $(OR_{g1})^{(1)}$	30.5882^{e} $(OR_{e1*g1})^{(1)}$	57.0980^{f} $(OR_{e2*g1})^{(1)}$	7.0353^{g} $(OR_{g2})^{(1)}$	25.6941^{h} $(OR_{e1*g2})^{(1)}$	45.8824^{i} $(OR_{e2*g2})^{(1)}$
95% $CI_{Grade\ II}$		2.1984-7.5307	4.8470-11.6043	4.5095-9.0598	19.3982-43.7804	42.8375-75.8043	3.6937-10.4085	16.0491-37.0938	34.8027-65.5538
$P_{Grade\ II}$		0.6746 $(\beta_{e1})^{(1)}$	0.9179 $(\beta_{e2})^{(1)}$	0.7866 $(\beta_{g1})^{(1)}$	1.4856 $(OR_{e1*g1})^{(1)}$	1.7566 $(\beta_{e2*g1})^{(1)}$	0.8473 $(\beta_{g2})^{(1)}$	1.4098 $(\beta_{e1*g2})^{(1)}$	1.6616 $(\beta_{e2*g2})^{(1)}$
Grade III (*n*=200)	3 (1.50)	8 (4.00)	13 (6.50)	12 (6.00)	29 (14.50)	43 (2150)	14 (7.00)	31 (15.50)	47 (23.50)
$OR^{a}_{Grade\ III}$	1.00	12.6061^{b} $(OR_{e1})^{(1)(2)}$	26.5098^{c} $(OR_{e2})^{(1)(2)}$	19.8095^{d} $(OR_{g1})^{(1)(2)}$	251.3332^{e} $(OR_{e1*g1})^{(1)(2)}$	496.8889^{f} $(OR_{e2*g1})^{(1)(2)}$	24.2667^{g} $(OR_{g2})^{(1)(2)}$	214.9333^{h} $(OR_{e1*g2})^{(1)(2)}$	407.3332^{i} $(OR_{e2*g2})^{(1)(2)}$
95% $CI_{Grade\ III}$		8.0724-19.5573	17.2628-32.4241	12.4194-25.9582	197.4072-375.9306	368.8164-579.0725	16.7806-35.2714	156.7430-2895.0426	362.6923-475.3762
$P_{Grade\ III}$		1.1006 $(\beta_{e1})^{(1)(2)}$	1.42324 $(\beta_{e2})^{(1)(2)}$	1.2969 $(\beta_{g1})^{(1)2)}$	2.4002 $(OR_{e1*g1})^{(1)(2)}$	2.6963 $(\beta_{e2*g1})^{(1)(2)}$	1.3850 $(\beta_{g2})^{(1)(2)}$	2.3323 $(\beta_{e1*g2})^{(1)(2)}$	2.6099 $(\beta_{e2*g2})^{(1)(2)}$

a: Adjusted according to gender, age, diet status, drinking status and smoking status; b: OR value by simple 100≤DPM<500 exposure (OR_{e1}); c: OR value by simple DPM≥500 exposure (OR_{e2}); d: OR value by simple heterozygote type exposure (OR_{g1}); e: OR value by the interaction of 100≤DPM<500 and heterozygote (OR_{e1g1}); f: OR value by the interaction of DPM≥500 and heterozygote (OR_{e2g1}); g: OR value by simple homozygous mutant type exposure (OR_{g2}); h: OR value by the interaction of 100≤DPM<500 and homozygous mutant (OR_{e1g2}); i: OR value by the interaction of DPM≥500 and homozygous mutant (OR_{e2g2}). $^{(1)}P<0.01$ *vs* Grade I; $^{(2)}P<0.01$ *vs* Grade II.

表9 *H. pylori*感染和NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T多态性在ESCC发病中的交互作用

Tab.9 Interaction between *H. pylori* infection and NADPH oxidase subunit p22phox gene-C242T polymorphism in ESCC [n (%)]

Groups	-C242T genotypes and *H. Pylori* infection status [n (%)]								
	CC+Non-infection	CC+100≤DPM<500	CC+DPM≥500	CG+Non-infection	CG+100≤DPM<500	CG+DPM≥500	GG+Non-infection	GG+100≤DPM<500	GG+DPM≥500
Control (n=200)	106 (53.00)	23 (11.50)	17 (8.50)	19 (9.50)	4 (2.00)	3 (1.50)	20 (10.00)	4 (2.00)	4 (2.00)
Grade I (n=200)	51 (25.50)	23 (11.50)	27 (13.50)	24 (12.00)	11 (5.50)	13 (6.50)	27 (13.50)	11 (5.50)	13 (6.50)
$OR^{a}_{Grade\ I}$	1.00	2.0784^{b} (OR_{e1})	3.3010^{c} (OR_{e2})	2.6254^{d} (OR_{g1})	5.7157^{e} (OR_{e1*g1})	9.0065^{f} (OR_{e2*g1})	2.8059^{g} (OR_{g2})	5.7157^{h} (OR_{e1*g2})	6.7549^{i} (β_{e2*g2})
95% $CI_{Grade\ I}$		1.2165-3.4716	1.8975-5.4706	1.8794-5.4036	3.2059-8.8945	6.9137-12.5496	1.4649-5.2871	3.7930-8.5063	3.9592-9.5945
$P_{Grade\ I}$		0.3177 (β_{e1})	0.5186 (β_{e2})	0.4192 (β_{g1})	0.7571 (OR_{e1*g1})	0.9546 (β_{e2*g1})	0.4481 (β_{g2})	0.7571 (β_{e1*g2})	0.8296
Grade II (n=200)	18 (9.00)	17 (8.50)	23 (11.50)	21 (10.50)	20 (10.00)	29 (14.50)	22 (11.00)	21 (10.50)	29 (14.50)
$OR^{a}_{Grade\ II}$	1.00	4.3527^{b} $(OR_{e1})^{(1)}$	7.9673^{c} $(OR_{e2})^{(1)}$	6.5088^{d} $(OR_{g1})^{(1)}$	29.4444^{e} $(OR_{e1*g1})^{(1)}$	56.9260^{f} $(OR_{e2*g1})^{(1)}$	6.4778^{g} $(OR_{g2})^{(1)}$	30.9167^{h} $(OR_{e1*g2})^{(1)}$	42.6944^{i} $(OR_{e2*g2})^{(1)}$
95% $CI_{Grade\ II}$		2.5725-7.1792	4.7594-11.9703	3.2926-10.4238	17.5902-41.9794	41.6439-75.5394	3.2375-9.2084	21.6724-45.2871	29.6598-55.2037
$P_{Grade\ II}$		0.6388 $(\beta_{e1})^{(1)}$	0.9013 $(\beta_{e2})^{(1)}$	0.8135 $(\beta_{g1})^{(1)}$	1.4690 $(OR_{e1*g1})^{(1)}$	1.7553 $(\beta_{e2*g1})^{(1)}$	0.8114 $(\beta_{g2})^{(1)}$	1.4902 $(\beta_{e1*g2})^{(1)}$	1.6304 $(\beta_{e2*g2})^{(1)}$
Grade III (n=200)	3 (1.50)	7 (3.50)	12 (6.00)	12 (6.00)	30 (15.00)	45 (22.50)	14 (7.00)	31 (15.50)	46 (23.00)
$OR^{a}_{Grade\ III}$	1.00	10.7536^{b} $(OR_{e1})^{(1)(2)}$	24.9412^{c} $(OR_{e2})^{(1)(2)}$	22.3158^{d} $(OR_{g1})^{(1)(2)}$	265.0000^{e} $(OR_{e1*g1})^{(1)(2)}$	529.7583^{f} $(OR_{e2*g1})^{(1)(2)}$	24.7333^{g} $(OR_{g2})^{(1)(2)}$	273.8279^{h} $(OR_{e1*g2})^{(1)(2)}$	406.3297^{i} $(OR_{e2*g2})^{(1)(2)}$
95% $CI_{Grade\ III}$		6.5913-17.8692	17.6328-35.8407	16.7291-33.4827	198.6917-305.9704	432.6493-652.8715	15.6108-32.5838	194.3328-365.2179	327.3965-513.0576
$P_{Grade\ III}$		1.0316 $(\beta_{e1})^{(1)(2)}$	1.3969 $(\beta_{e2})^{(1)(2)}$	1.3486 $(\beta_{g1})^{(1)(2)}$	2.4232 $(OR_{e1*g1})^{(1)(2)}$	2.7241 $(\beta_{e2*g1})^{(1)(2)}$	1.3933 $(\beta_{g2})^{(1)(2)}$	2.4375 $(\beta_{e1*g2})^{(1)(2)}$	2.6089 $(\beta_{e2*g2})^{(1)(2)}$

a: Adjusted according to gender, age, diet status, drinking status and smoking status; b: OR value by simple 100≤DPM<500 exposure (OR_{e1}); c: OR value by simple DPM≥500 exposure (OR_{e2}); d: OR value by simple heterozygote type exposure (OR_{g1}); e: OR value by the interaction of 100≤DPM<500 and heterozygote (OR_{e1g1}); f: OR value by the interaction of DPM≥500 and heterozygote (OR_{e2g1}); g: OR value by simple homozygous mutant type exposure (OR_{g2}); h: OR value by the interaction of 100≤DPM<500 and homozygous mutant (OR_{e1g2}); i: OR value by the interaction of DPM≥500 and homozygous mutant (OR_{e2g2}). $^{(1)}P<0.01$ *vs* Grade I; $^{(2)}P<0.01$ *vs* Grade II.

NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T突变纯合型的交互作用增加了ESCC的发病风险，-C34G（GG）和-C242T（TT）基因型对ESCC的发生风险有相互显著放大效应；另外本研究显示，两基因的杂合子与杂合子之间、杂合子与突变纯合型之间也存在明显的正向交互作用(γ均大于1)。通过对*H. pylori*感染状况的分析发现，100≤DPM<500 和DPM≥500 *H. pylori*感染者患ESCC的风险明显高于未感染者，而DPM≥500 *H. pylori* 感染者患ESCC的风险性则又明显高于100≤DPM<500 *H. pylori* 感染者($P<0.01$)；数据分析显示*H. pylori*感染与-C34G（CG）、-C34G（GG）、-C242T（CT）和-C242T（TT）基因型均存在正向交互作用（γ均大于1），携带-C34G（CG）、-C34G（GG）、-C242T（CT）和-C242T（TT）基因型者*H. pylori*感染的危害效应更大；-C34G（CG）、-C34G（GG）、-C242T（CT）和-C242T（TT）与*H. pylori*感染交互作用OR_{eg}均大于相应相应的OR_e×OR_g，显示-C34G（CG）、-C34G（GG）、-C242T（CT）和-C242T（TT）与*H. pylori*感染交互作用机制在ESCC发生中均为超相乘模型。*H. pylori*感染可能通过炎症、纤维蛋白原自身免疫反应来引起胰岛细胞损伤，胰岛功能下降，胰岛素分泌减少；*H. pylori*慢性感染可诱导炎症反应，刺激炎症因子如TNF-、IL-1β、IL-6、及IL-8等释放。而低水平的炎症状态 正是胰岛素 抵 抗 的 病 因之一，TNF-α和IL-6作为炎症递质，参与了胰 岛素抵抗的发生和 发展，它们可以干扰胰岛素信号转 导，降低胰岛素的敏感性，它们还能影响脂代谢及脂肪因子，降低胰 岛素作用。另外*H. pylori*感染者的胃肠激素水平有明显改变，*H. pylori*感染升高血清胃泌素浓度和降低生长抑素的浓度，胃泌素增加食物和糖刺激的胰岛素释放，生长抑素调节胰腺胰岛素的分泌，抑制胰岛素的释放，通过负反馈调节导致胰岛素抵抗，提示*H. pylori*感染可能通过主要慢性炎症和影响胃肠激素对胰岛素的调节，而导致胰岛素抵抗，为恶性肿瘤的发生创造了条件[24-25]。通常情况下生物体内的活细胞均可产生氧自由基，因存在着包括超氧化物歧化酶在内的自由基清除系统，可及时地清除体内过剩的自由基，维持自由基的动态平衡；*H. pylori*感染致不同程度的急、慢性炎症，多形核嗜中性粒细胞等在吞噬*H. pylori*时产生大量的超氧自由基(O2·-)、过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基(·OH)等活性氧，释放至细咆介质及体液内，导致体内氧化和抗氧化平衡失调及一 系列 自由基反应加剧[26]。过量氧自由基通过血液进入支气管上皮细胞，促使支气管上皮细胞发生脂质过氧化及启动新的自由基反应，增加细胞恶变的风险性。这可能是*H. pylori*感染可单独增加及与PPAR-γ2基因-C34G与NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T突变基因型协同增加ESCC发生风险性的重要原因。

上述数据为ESCC Broder Ⅰ级、Ⅱ级和Ⅲ级各组分别和健康对照组配对行χ^2检验所得，显示*H. pylori*感染与-C34G（CG）、-C34G（GG）、-C242T（CT）和-C242T（TT）基因型均是ESCC发生的易患因素，*H. pylori*感染与基因多态性的交互作用增加了ESCC发生风险。为进一步了解*H. pylori*感染与基因多态性及交互作用在ESCC进展中作用，本研究又对Ⅰ级、Ⅱ级和Ⅲ级之间的*H. pylori*感染频率、-C34G和-C242T基因型频率和等位基因频率进行χ^2检验和相对危险度比较，研究显示，无论是单纯*H. pylori*感染、单纯-C34G或-C242T突变基因型、联合突变基因型、*H. pylori*感染联合突变基因型的分布频率及相应OR值在Ⅰ级、Ⅱ级和Ⅲ之间的具有明显差异($P<0.01$)，这进一步揭示*H. pylori*感染、-C34G和-C242T基因变异不仅增加ESCC发生的风险，而且在ESCC病情进展演变发挥重要作用。

ESCC是涉及环境因子和多种基因相互作用的复杂过程，本研究提示PPAR-γ2基因-C34G突变纯合型与NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T突变基因型的个体属ESCC高危险人群, ESCC防治方案中应加以重视，虽然尚不能通过改变其ESCC易感的基因型来防治ESCC，但可以通过PPAR-γ2基因-C34G突变纯合型与NADPH氧化酶p22phox亚基基因-C242T基因检测，预测个体发生ESCC的风险性，采取相应的控制环境病因的措施如根除*H. pylori*或调控基因表达以达到有效预防ESCC的目的。

参考文献：

[1] Holzer R, Fulford D, Nedderman M, et al. Tumor cell expression of vascular endothelial growth factor receptor 2 is an adverse prognostic factor in patients with squamous cell carcinoma of the lung[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80292.

[2] Orgel E, Mittelman D. The links between insulin resistance, diabetes, and cancer[J]. Curr Diab Rep, 2013, 13(2): 213-22.

[3] Sehitogulları A, Aslan M, Sayır F, et al. Serum paraoxonase-1 enzyme activities and oxidative stress levels in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Redox Rep, 2014, 19(5): 199-205.

[4] Cheng XJ, Lin JC, Tu SP. Etiology and Prevention of Gastric Cancer[J]. Gastrointest Tumors, 2016, 3(1): 25-36.

[5] Ohba R, Iijima K. Pathogenesis and risk factors for gastric cancer after Helicobacter pylori eradication [J]. World J Gastrointest Oncol, 2016, 8(9): 663-672.

[6] Deng B, Li YF, Zhang Y, et al. Helicobacter pylori infection and lung cancer: a review of an emerging hypothesis [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(6): 1189-95.

[7] Tu KS, Zheng X, Dou CW, et al. MicroRNA-130b promotes cell aggressiveness by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(11): 20486-99.

[8] Wang R, Dashwood M, Nian H, et al. NADPH oxidase overexpression in human colon cancers and rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) [J]. Int J Cancer, 2011, 128(11): 2581-90.

[9] Deyhimi Parviz, Torabinia Nakisa, Torabinia Aitin. A comparative study of histological grade and expression of Ki67 protein in oral squamous cell carcinoma in young and old patients[J]. Dent Res J (Isfahan), 2013, 10(4): 514-7.

[10] Rey JW, Noetel Andrea, Hardt A\, et al. Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ2 in patients with fatty liver diseases[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(46): 5830-7.

[11] de Oliveira Alvim R, Santos P Caleb, Dias RG, et al. Association between the C242T polymorphism in the p22phox gene with arterial stiffness in the Brazilian population[J]. Physiol Genomics, 2012, 44(10): 587-92.

[12] Khoury J, Wagener K. Epidemiological evaluation of the use of genetics to improve the predictive value of disease risk factors[J]. Am J Hum Genet, 1995, 56(4): 835-44.

[13] Friedenreich CM, Langley AR, Speidel TP, et al. Case-control study of markers of insulin resistance and endometrial cancer risk [J]. Endocr Relat Cancer, 2012, 19(6): 785-92.

[14] Zhao X, Xue J, Wang L, et al. Involvement of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α/γ in the therapeutic effect of osthole on high-fat and high-sucrose-induced steatohepatitis in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 22(1): 176-81.

[15] Kim HW, Lim EJ, Jang HH, et al. 24-Methylenecycloartanyl ferulate, a major compound of γ-oryzanol, promotes parvin-beta expression through an interaction with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 in human breast cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 468(4): 574-579.

[16] Yao YS, Li J, Jin YL, et al. Association between PPAR-γ2 Pro12Ala polymorphism and obesity: a meta-analysis[J]. Mol Biol Rep, 2015, 42(6): 1029-38.

[17] Youssef M, Mohamed N, Afef S, et al. Combined effects of the C161T and Pro12Ala PPARγ2 gene variants with insulin resistance on metabolic syndrome: a case-control study of a central Tunisian population[J]. J Mol Neurosci, 2014, 52(4): 487-92.

[18] 李秀丽, 章 琳, 李影娜, 等. PPARγ2基因Pro12Ala多态性与2型糖尿病及其一级亲属血脂的相关性研究[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2013, 34(5): 632-6.

[19] Shetty SR, Babu S, Kumari S, et al. Status of salivary lipid peroxidation in oral cancer and precancer[J]. Indian J Med Paediatr Oncol, 2014, 35(2): 156-8.

[20] Borrego S, Vazquez A, Dasí F, et al. Oxidative stress and DNA damage in human gastric carcinoma: 8-Oxo-7'8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) as a possible tumor marker[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(2): 3467-86.

[21] Ge JY, Ding ZJ, Song Y, et al. Smoking dose modifies the association between C242T polymorphism and prevalence of metabolic syndrome in a Chinese population[J]. PLoS One, 2012, 7 (3): e31926.

[22] Hashad M, Abdel Rahman F, Abdel-Maksoud M, et al. C242T polymorphism of NADPH oxidase p22phox gene reduces the risk of coronary artery disease in a random sample of Egyptian population[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(4): 2281-6.

[23] Genius J, Grau J, Lichy C. The C242T polymorphism of the NAD (P)H oxidase p22phox subunit is associated with an enhanced risk for cerebrovascular disease at a young age[J]. Cerebrovasc Dis, 2008, 26(4): 430-3.

[24] Abenavoli L, Milic N, Masarone M, et al. Association between non-alcoholic fatty liver disease, insulin resistance and *Helicobacter pylori*[J]. Med Hypotheses, 2013, 81(5): 913-5.

[25] Polyzos SA, Kountouras J, Papatheodorou A, et al. *Helicobacter pylori* infection in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Metabolism, 2013, 62(1): 121-6.

[26] Na HK, Woo JH. *Helicobacter pylori* Induces hypermethylation of CpG islands through upregulation of DNA methyltransferase: Possible involvement of reactive oxygen/nitrogen species [J]. J Cancer Prev, 2014, 19(4): 259-64.

（编辑：吴锦雅）